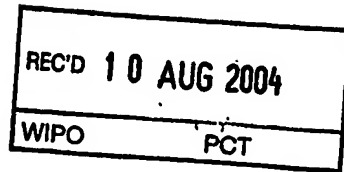


29. 07. 2004



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 32 854.8

Anmeldetag: 18. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität
zu Berlin, 10098 Berlin/DE

Bezeichnung: 7a5/Prognostin und dessen Verwendung
für die Tumordiagnostik und Tumorthherapie

IPC: C 07 K 14/435

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Letang

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

7a5/Prognostin und dessen Verwendung für die Tumordiagnostik und Tumorthherapie

Die vorliegende Erfindung betrifft die Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid von 7a5/Prognostin kodiert und dessen Verwendungen, insbesondere für die Tumordiagnostik und Tumorthherapie bei metastasierenden Tumoren.

Beschreibung

Die Entstehung von Metastasen ist ein komplexer mehrstufiger Prozeß, der eine Vielzahl molekularer und zellulärer Veränderungen umfaßt, und prinzipiell in vier definierte Phasen eingeteilt werden kann: a) Wachstum und Vaskularisierung des Primärtumors, b) Ablösen und Eindringen einzelner invasiver Zellen in das Gefäßsystem, c) Dissemination im Gefäßsystem und Extravasation am Zielorgan, und schließlich d) Bildung von Makrometastasen aus den eingewanderten Tumorzellen.

So verlieren bestimmte Zellen eines Primärtumors den Zell-Zell-Kontakt, invadieren durch die extrazelluläre Matrix und werden über Blut- und Lymphsystem verbreitet. Diese Tumorzellen können schließlich extravadiieren, sich an bestimmte Zielorgane anheften und dort proliferieren, was zur Ausbildung von Metastasen führt.

Eine Reihe von generell Metastasierungs-assoziierten Molekülen wurden bereits beim Vergleich von Primärtumor und Metastase identifiziert. So führt die Fehlregulation von Zelladhäsionsmolekülen (z.B. Cadherine) in Primärtumoren zum Verlust des Zell-Zell-Kontakts und ermöglicht den mobilisierten Tumorzellen die Invasion und das Eindringen in Blut- und Lymphgefäßsystem. Tumorzellen, die durch Blut- und Lymphgefäßsystem im Körper verteilt wurden, heften sich an die Endothelzellen der Gefäße, vermittelt durch Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen (z.B. E-Selectin, LP AM, VCAM-1, LuECAM-1, ICAM-1), an die bestimmte Oberflächenmoleküle der Tumorzellen (z.B. VLA-4, LFA-1) selektiv binden können. Im weiteren Verlauf der Metastasierung muß eine Bindung der metastasierenden Tumorzellen an die Komponenten der extrazellulären Matrix erfolgen, z.B. an Laminin, Collagene Fibronectin und Vitronectin. Dies wird durch verschiedene Integrine vermittelt, Tumorzellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotential unterscheiden sich in der Adhäsion zu den

verschiedenen Elementen der extrazellulären Matrix. Von großer Bedeutung für die Extravasation und die Migration der Tumorzellen sind weiterhin die Matrix-degradierenden Enzyme, z.B. die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs, insbesondere MMP-9 und MMP-2) im System mit ihren Gewebe-Inhibitoren (Tissue Inhibitors of MMPs, TIMPs). Die Aktivität dieser Moleküle kann über das System Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator/Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPA/uPA-Rezeptor) gewebespezifisch reguliert werden, gezeigt z.B. für die Expression von MMP-9 bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome.

Für die Adhäsion von metastasierenden Tumorzellen an die Zielorgane sind wiederum spezifische Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, LPAM, E-Selectin, VLA_s, ICAM-1 und verschiedene Integrine) entscheidend [siehe unter anderem Streit M, et al. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *Recent Results Cancer Res.* 1996;142:19-50. Imai K, et al. Regulation of integrin function in the metastasis of colorectal cancer *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1998 Jul;99(7):415-8. Krause T, Turner GA. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis.* 1999 May;17(3):183-92, und Portera CA Jr, et al. Molecular determinants of colon cancer metastasis. *Surg Oncol.* 1998 Nov-Dec;7(3-4):183-95.]. An den Metastasierungszielorganen müssen die Tumorzellen eine bestimmte Mikro-Umgebung vorfinden, um adhären und proliferieren zu können ("seed and soil-Hypothese). Tumorzellen können sich zunächst im gesamten Körper verteilen, aber dann nur in bestimmten Organen Metastasen generieren. Der entscheidende Faktor der Metastasierung ist demnach nicht die Migration der Tumorzellen zu den Zielorganen, sondern das Potential der Tumorzellen, in einer bestimmten Umgebung im Zielorgan zu proliferieren. "Schlafende" Tumorzellen können oft jahrelang im Körper vorhanden sein, ohne daß Metastasen nachweisbar sind.

Die oben beschriebene "seed and soil-Hypothese" ist eine der am meisten akzeptierten Theorien für die organspezifische Metastasierung. Daneben existiert eine zweite Theorie, nach der Endothelzellen in den Blutgefäßen der Metastasierungs-Zielorgane bestimmte Adhäsionsmoleküle exprimieren, wodurch zirkulierende Tumorzellen dort festgehalten werden und somit die Metastasierung in diesen spezifischen Organen stattfindet. Die dritte, sogenannte Chemoattraktions-Theorie besagt, daß organspezifische Moleküle in den Blutkreislauf gelangen, die die zirkulierenden Tumorzellen dazu anregt, zu den entsprechenden Metastasierungsorganen zu wandern und dort Metastasen auszubilden.

Die bisherigen Untersuchungen zur organspezifischen Metastasierung machen deutlich, daß offensichtlich in einem längeren Prozeß Gene selektiv angeschaltet (oder abgeschaltet) werden müssen, die zum Zeitpunkt der Verbreitung der Tumorzellen im Körper noch nicht aktiv (bzw. noch aktiv) sind. Daher sind Genexpressions-Analysen unabdingbar, die untersuchen, welche Gene in Metastasen bestimmter Zielorgane im Vergleich zu den entsprechenden Primärtumoren verschieden exprimiert werden.

Jährlich werden ca. 20000 Neuerkrankungen für das Kolonkarzinom in der Bundesrepublik registriert. Für das Kolonkarzinom sind verschiedene Metastasierungsorte bekannt, z.B. Leber, Lymphknoten, Lunge, Knochen und Hirn.

Die Robert-Rössle-Klinik ist eine onkologisch orientierte Klinik mit dem Schwerpunkt Chirurgie. Pro Jahr werden ca. 300 Patienten mit Kolonkarzinomen behandelt, davon weisen ca. 150-170 Patienten Metastasen des Primärtumors auf. Die beobachtete Metastasierungsfrequenz der Zielorgane entspricht der in der Literatur beschriebenen, mit 80% Lebermetastasen und 15% Lungenmetastasen. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 20-25%, bei solitären Metastasen (Leber, Lunge) allerdings nur etwa 5%.

Die Leber stellt das bedeutsamste Zielorgan für die Metastasierung des Kolonkarzinoms dar, da die Tumorzellen - vermittelt über die Pfortader - in der Leber festgehalten werden und sich danach zu anderen Organen ausbreiten.

Jedoch ist auch bekannt, daß oftmals Metastasen z.B. in der Lunge oder im Knochen vorhanden sind, ohne daß Metastasen in der Leber festgestellt wurden. Damit stellt das metastasierende Kolonkarzinom ein interessantes Modell für die Identifizierung und Analyse von Genen dar. eine differentielle Genexpression bei der organspezifischen Metastasierung weiter zu untersuchen.

Die von derartigen Genen kodierte Proteine könnten eine direkte Funktion für die Adhäsion von Tumorzellen an bestimmte Gewebe und Organe haben (organspezifische Adhäsionsmoleküle). Ebenso könnten sie durch Wechselwirkungen mit den normalen Zellen der Metastasierungsorgane die Zellproliferation und das Wachstum der Metastasen in einer bestimmten Umgebung ermöglichen (z.B. spezifische Rezeptoren und Effektoren). Weiterhin ist denkbar, daß solche Proteine für die intrazelluläre Vorbereitung der Tumorzellen auf die Metastase-

rung in einem bestimmten Zielorgan benötigt werden, so innerhalb verschiedener Signaltransduktionskaskaden und Regulationsmechanismen. In diesem Zusammenhang sind Proteine mit entsprechenden Protein-Protein-Interaktionsdomänen von Bedeutung, z.B. mit Src-Homology-Domains (SH3-, SH2-Domänen) oder EphA2-Homology-Domains (EH-Domänen). Diese Domänen sind definierte Sequenzmotive, die eine spezifische Bindung an Liganden ermöglichen. SH3-Domänen sind u.a. in solchen Proteinen vorhanden, die bestimmte Liganden zu Kinasen oder deren Substraten geleiten und daher eine wichtige Rolle bei der Regulation von Tyrosinkinase-Signaltransduktionswegen spielen.

Insbesondere ist die Identifizierung solcher Markergene wertvoll, anhand deren Expression im primären Karzinom eine wahrscheinliche Metastasierung in bestimmte Zielorgane vor dem eigentlichen Metastasierungsereignis prognostiziert und, basierend darauf, evtl. verhindert werden kann,

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, solche weiteren Markergene zur Verfügung zu stellen, mit denen eine verbesserte Diagnose und Therapie im Hinblick auf Metastasierung in bestimmte Zielorgane erreichen läßt.

Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird diese Aufgabe durch das zur Verfügung stellen einer Nukleinsäuresequenz gelöst, die für das Polypeptid von 7a5/Prognostin kodiert, ausgewählt aus der Gruppe: a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No: 1 angegebenen Sequenz, b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID No: 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz ableiten, c) Derivate der in SEQ ID No: 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz, die für die Polypeptide mit der in SEQ ID No: 2 angegebenen Aminosäuresequenz kodieren und mindestens 80% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist, und d) einer humanen genomischen Nukleinsäuresequenz, welche das Gen für 7a5/Prognostin umfaßt und Polymorphismen aufweist. Ein weiterer Aspekt betrifft das ebenfalls zur Verfügung gestellte 7a5/Prognostin-Polypeptid, kodiert durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, insbesondere nach der Aminosäuresequenz der SEQ ID No: 2.

Zur Aufreinigung der erfindungsgemäßen Polypeptide kann ein weiteres/weiteres Polypeptid("tag") angefügt sein. Protein-tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an

eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern, ohne den Komplex in nennenswertem Maße zu eluieren und anschließend gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele der dem Fachmann bekannten Protein-tags sind ein (His)₆-tag, ein Myc-tag, ein FLAG-tag, ein Strep-tag, ein Strep-tag II, ein Hämagglutinin-tag, Glutathion-Transferase (GST)-tag, Intein mit einem Affinitäts-Chitin-binding-tag oder Maltose-bindendes Protein (MBP)-tag. Diese Protein-tags können sich N-, C-terminal und/oder intern befinden.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Polypeptiden können alle erfindungsgemäßen Polypeptide oder deren Teile unter zellfreien Bedingungen hergestellt worden sein, z. B. durch Synthese oder durch *in vitro*-Translation. So kann das gesamte Polypeptid oder Teile davon zum Beispiel mit Hilfe der klassischen Synthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Teile der erfindungsgemäßen Polypeptide eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Nukleinsäuren können alle erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder deren Teile auch synthetisch hergestellt worden sein. Weiterhin kann zur Durchführung der Erfindung eine Nukleinsäure verwendet werden, die synthetisch hergestellt worden ist. So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure beispielsweise chemisch anhand der in den von SEQ ID No. 2 beschriebenen Proteinsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes z. B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z. B. Uhlmann & Peyman 1990, Chemical Reviews 90:543-584).

Die Zugangsnummer XP_294213.1 (eingetragen am 28-APR-2003 in die Datenbank) beschreibt ein menschliches Polypeptid mit einer Länge von 816 Aminosäuren. Diese als ähnlich zu dem EST AI594717 [Homo sapiens] beschriebene Sequenz entspricht in den letzten 813 Aminosäuren der SEQ ID No. 2 und wurde aus NCBI contig NT_007819 durch eine automatisierte Computeranalyse mittels des Programms „GenomeScan“ erzeugt. Das Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert. Es sind weder Funktion und noch prognostischer Wert für dieses Gen bekannt. Die vorliegende Erfindung stellt somit die Identifizierung der genomischen DNA-Sequenz, der full length-cDNA und die der putativen Proteinsequenz für 7a5/Prognostin zur Verfügung.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Oligonukleotid, das spezifisch an eine Nukleinsäuresequenz gemäß der vorliegenden Erfindung hybridisiert. Oligonukleotide stellen wichtige Werkzeuge dar, die zum einen in PCR-Reaktionen, aber auch als Sonden in Hybridisierungsreaktionen verwendet werden können. Weitere Verwendungsmöglichkeiten sind als Therapeutika in der z.B. Gentherapie oder in Mutagenesetechniken vorhanden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können in Form von Nukleinsäuren umfassend DNA, dsDNA, RNA, mRNA, siRNA, PNA und/oder CNA vorliegen. Die Oligonukleotide können weiterhin als „sense“- oder „antisense“-Oligonukleotide vorliegen. Für auf Hybridisierung basierende Nachweistechiken können die Oligos darüber hinaus geeignet markiert sein, zum Beispiel durch Farbstoffe, Radionuklide, Enzyme oder Massen- oder Ladungsmarker. Die Markierung richtet sich nach dem jeweiligen Nachweisverfahren, das angewendet werden soll. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA mit einer Länge von mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 12 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nukleotiden. Die Obergrenze für Oligonukleotide wird durch die jeweilige praktische Verwendung bestimmt, wobei üblicherweise maximale Länge von 50-200 Nukleotiden bevorzugt sind.

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- oder Exonukleasen, insbesondere durch in der Zelle vorkommende DNasen und RNasen, abgebaut. Deshalb ist es vorteilhaft, die Nukleinsäure zu modifizieren, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so daß über einen langen Zeitraum eine hohe Konzentration der Nukleinsäure in der Zelle beibehalten wird (Beigelman et al. 1995, Nucleic Acids Res. 23:3989-94; Dudycz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehrerer Internukleotid-Phosphatgruppen oder durch die Einführung einer oder mehrerer Nicht-Phosphor-Internukleotide, erhalten werden.

Geeignete modifizierte Internukleotide sind in Uhlmann und Peymann (1990, Chem. Rev. 90:544) zusammengefaßt (siehe auch Beigelman et al. 1995, Nucleic Acids Res. 23:3989-94; Dudycz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Modifizierte Internukleotid-Phosphatreste und/oder nicht-Phosphoresterbindungen in einer Nukleinsäure, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphoramidat, Phosphorodithioat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise

se Siloxanbrücken, Carbonatbrücken, Carboxymethylester, Acetamidatbrücken und/oder Thiobrücken enthalten. Es ist auch beabsichtigt, daß diese Modifizierung die Haltbarkeit einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden kann, verbessert.

Für die Expression des betreffenden Gens ist im allgemeinen eine doppelsträngige DNA bevorzugt, wobei der für das Polypeptid kodierende DNA-Bereich besonders bevorzugt ist. Dieser Bereich beginnt mit dem ersten in einer Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak 1987, Nucleic. Acids Res. 15:8125-48) liegenden Start-Codon (ATG) bis zum nächsten Stop-Codon (TAG, TGA bzw. TAA), das im gleichen Leseraster zum ATG liegt. Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen ist die Konstruktion von anti-sense Oligonukleotiden (Zheng und Kemeny 1995, Clin. Exp. Immunol. 100:380-382; Nellen und Lichtenstein 1993, Trends Biochem. Sci. 18:419-23) und/oder Ribozymen (Amarzguiou et al. 1998, Cell. Mol. Life Sci. 54:1175-202; Vaish, et al. 1998, Nucleic Acids Res. 26:5237-42; Persidis 1997, Nat. Biotechnol. 15:921-2; Couture und Stinchcomb 1996, Trends Genet. 12:510-5). Mit "antisense"-Oligonukleotiden kann man die Stabilität der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verringern und/oder die Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäure inhibieren. So kann beispielsweise die Expression der entsprechenden Gene in Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verringert werden. Oligonukleotide können sich daher als Therapeutikum eignen. Für die Verwendung als Sonde oder als "antisense"-Oligonukleotid ist eine einzelsträngige DNA oder RNA bevorzugt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, das erfindungsgemäße Polypeptid oder das erfindungsgemäße Oligonukleotid zur Behandlung von Erkrankungen. Die Möglichkeit der Verwendung dieser Substanzen im Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen war bisher nicht bekannt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, adenoviralen Vektors, retroviralen Vektors (Miller, et al. "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression", BioTechniques Vol. 7, No. 9, p 980, 1989) und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält. So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten sein. Vorzugsweise enthält der gentherapeutisch wirksame

Vektor zellspezifische regulatorische Sequenzen, die funktionell mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verbunden sind. Die Expressionsvektoren können prokaryontische oder eukaryontische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryontische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryontische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. 1994, Nucleic. Acids Res. 22:5767-5768), für die Expression in Insektenzellen z. B. *Baculovirus*-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den Met 25, GAL 1 oder ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. 1983, J. Biol. Chem. 258:2674-2682), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor, für die Expression in Insektenzellen (siehe z. 13. EP-B1-0 127 839). Für die Expression in Säugetierzellen sind beispielsweise Promotoren geeignet, die eine konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryontischen Zellen erlauben. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer und/oder Repressorsequenzen. Beispiel für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40 Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. 1981, Nature 214:228-232) und weitere virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV. Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen et al. 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5:516-20).

Um die Einführung von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryontischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen oder nicht-viralen Vektors vorliegen. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Retroviren, Baculoviren, Vakziniaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als

nicht-virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder poly-Lysin konjugierte DNA.

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, beispielsweise Adenovirusvektoren oder retrovirale Vektoren (Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3:466-76; Springer et al. 1998, Mol. Cell. 2:549-58).

Ein bevorzugter Mechanismus, erfindungsgemäße Polypeptide *in vivo* zur Expression zu bringen, ist der virale Gen-Transfer, insbesondere mit Hilfe retroviraler Partikel. Diese werden vorzugsweise genutzt, entsprechende Zielzellen, vorzugsweise T-Lymphozyten, des Patienten *ex vivo* mit den für erfindungsgemäße Polypeptide kodierenden Genen oder Nukleotidsequenzen durch Transduktion zu versehen. Die Zielzellen können daraufhin im Sinne eines adoptiven Zelltransfers wieder in den Patienten reinfundiert werden, um mit der *de novo* eingefügten Spezifität tumorizide und/oder immunmodulierende Effektorfunktionen zu übernehmen. Es wurden auf diesem Wege sehr gute gentherapeutische Erfolge in der Behandlung der durch Immuninkompetenz gekennzeichneten SCID-X1- Krankheit bei Neugeborenen erzielt, indem hämatologische Vorläuferzellen mit einem analogen intakten Transgen einer in den Kindern vorkommenden nicht-funktionellen mutierten Variante des α -Kettengens, das für die Differenzierung in die verschiedenen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems essentiell ist, retroviral versehen wurden (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, den Gentransfer *in vivo* durchzuführen, einerseits durch präferentiell stereotaktische Injektion der infektiösen Partikel, andererseits durch direkte Applikation von Viren-produzierenden Zellen (Oldfield, et al. Hum. Gen. Ther., 1993, 4:39-69).

Die zum Transfer von Genen häufig eingesetzten viralen Vektoren sind nach heutigem Stand der Technik vorwiegend retrovirale, lentivirale, adenovirale und adeno-assoziierte virale Vektoren. Diese sind von natürlichen Viren abgeleitete zirkuläre Nukleotidsequenzen, in denen zumindest die viralen Strukturprotein-kodierenden Gene durch das zu transferierende Konstrukt ausgetauscht werden. Neue, nicht-virale Vektoren bestehen aus autonomen, sich selbst-integrierenden DNS-Sequenzen, den Transposonen, die durch z.B. liposomale Transfektion in die Wirtszelle eingeschleust werden und erstmals erfolgreich zur Expression humaner Transgene in Säugerzellen eingesetzt wurden (Yant et al., 2000).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Hautzellen, erreicht werden kann (Alexander und Akhurst 1995, Hum. Mol. Genet. 4:2279-85). Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (1987, supra) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleoyloxpropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6982-6986; Felgner et al. 1994, J. Biol. Chem. 269:2550-2556; Gao und Huang. 1991, Biochim. Biophys. Acta 1189:195-203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioctadecylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transfer von Nukleinsäuren in die Zelle erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al. 1999, Gene Therapy 6:282; Brandén et al 1999, Nature Biotech. 17:784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Cytoplasma der Zelle ermöglichen (Kiehler et al 1997, Bioconj. Chem. 8:213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peymann 1990, supra). Eine andere besonders geeignete Form von gentherapeutischen Vektoren läßt sich dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure auf Goldpartikeln aufbringt und diese mit Hilfe der sogenannten "Gene Gun" in Gewebe, bevorzugt in die Haut, oder Zellen schießt (Wang et al., 1999, J. Invest. Dermatol. 112:775-81).

Für die gentherapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist es auch von Vorteil, wenn der Teil der Nukleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, ein oder mehrere nicht kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Polypeptids, und/oder eine polyA-Sequenz, insbesondere die natürlich vorkommende polyA-Sequenz oder eine SV40 Virus polyA-Sequenz, vor allem am 3'-Ende des Gens enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA erreicht werden kann

(Jackson 1993, Cell 74:9-14 und Palmiter et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:478-482).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann einen rekombinanten prokaryontischer oder eukaryontischer Wirtsorganismus, der mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor enthält. Der Wirtsorganismus kann aus einer diploiden Zelle, einer Pflanzenzelle, einer Säugerzelle, einer Nematoden zelle, einer Fischzelle, einer Insektenzelle und, insbesondere, einer nicht-menschlichen Stammzelle bestehen. Ein bevorzugtes Beispiel wäre eine Maus-Stammzelle. Weiterhin stellt die Erfindung einen rekombinanten nicht-menschlichen Organismus zur Verfügung, insbesondere einen genetisch defizienten oder "Knock-out"-Säuger (wie eine Ziege oder Schaf), -Nager (wie ein Kaninchen, Maus, Ratte oder Hamster), -Nematode (wie *Caenorhabditis elegans*), -Fisch (wie ein Zebrafisch), -Pflanze (wie *Arabidopsis thaliana*, Mais, Reis, Weizen oder Kartoffel), -Insekt oder Qualle, bei dem das entsprechende Gen für 7a5/Prognostin mutiert oder deletiert wurde. Diese Versuchsorganismen sind wertvolle Hilfsmittel und können z.B. zum Screening nach Bindungspartnern verwendet werden (siehe z.B. unten). Verfahren zur Herstellung solcher Organismen sind dem Fachmann aus der einschlägigen Literatur bekannt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon zur Diagnose, Prognose und Therapie-Optimierung von mit 7a5/Prognostin-Expression assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, der gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichtet ist und mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden spezifisch reagiert, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Kopplung an geeignete Träger, wie z. B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können. Dieser Antikörper ist entweder polyklonal oder monoklonal, bevorzugt ist ein monoklonaler Antikörper. Unter dem Begriff Antikörper versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung auch gentechnisch hergestellte und gegebenenfalls modifizierte Antikörper bzw. antigenbindende Teile davon, wie z.B. chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper, multifunktionelle Antikörper, bi- oder oligospezifische Antikörper, einzelsträngige Antikörper, F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmente (siehe z.B. EP-B1-0 368 684, US 4,816,567, US 4,816,397, WO 88/01649, WO 93/06213, WO 98/24884). Die erfindungsgemäßen Antikörper können zur Diagnose, Therapie-Überwachung und/oder Behand-

lung von mit 7a5/Prognostin-Expression assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen verwendet werden. Ein weiterer Aspekt betrifft die Herstellung von Antikörpern (pAK, mAK) für die Evaluierung histologischer Schnitte.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose und/oder Behandlung von mit 7a5/Prognostin-Expression Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder funktioneller Äquivalente davon oder Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure immunisiert wird.

Das Verfahren erfolgt nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon oder diese(s) kodierende Nukleinsäure(n), gegebenenfalls in Anwesenheit von z. B. inkompletten Freundesches Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (siehe z. B. Diamond et al. 1981, The New England Journal of Medicine, pp. 1344-1349). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z. B. über Säulenchromatographie reinigen. Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (1991, Nature 349: 293-299) hergestellt werden.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder einen erfindungsgemäßen Antikörper, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger und/oder Hilfsstoff.

Die Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, z.B. in Form von Arzneimitteln mit einem Gehalt an erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, erfindungsgemäßem Polypeptid, erfindungsgemäßen Oligonukleotiden oder erfindungsgemäßen Antikörpern bzw. deren Einsatz bei der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt in üblicher Weise anhand geläu-

figer pharmazeutisch-technologischer Verfahren. Hierzu werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, erfindungsgemäßes Polypeptid, erfindungsgemäße Oligonukleotide oder ein erfindungsgemäßer Antikörper mit geeigneten, pharmazeutisch annehmbaren Hilfs- und Trägerstoffen zu den für die verschiedenen Indikationen und Applikationsorten geeigneten Arzneiformen verarbeitet.

Dabei können die Arzneimittel in der Weise hergestellt werden, daß die jeweils erwünschte Freisetzungsrage, z.B. eine rasche Anflutung und/oder ein Retard- bzw. Depoteffekt erzielt werden. Ein Medikament kann dabei eine Salbe, Gel, Pflaster, Emulsion, Lotion, Schaum, Creme oder mischphasigen oder amphiphile Emulsionssysteme (Öl/Wasser-Wasser/Öl-Mischphase), Liposom, Transfersom, Paste oder Puder sein.

Der Begriff "Hilfsstoff" bedeutet erfindungsgemäß jedes, nicht-toxische, feste oder flüssige Füll-, Verdünnungs-, oder Verpackungsmaterial, solange es nicht ungebührnd nachteilhaft mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül, einem erfindungsgemäßen Polypeptid, einem erfindungsgemäßen Oligonukleotid oder einem erfindungsgemäßen Antikörper oder dem Patienten reagiert. Flüssige galenische Hilfsstoffe sind zum Beispiel steriles Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Zuckerlösungen, Ethanol und/oder Öle. Galenische Hilfsstoffe zur Herstellung von Tabletten und Kapseln können zum Beispiel Bindemittel und Füllmaterial enthalten.

Weiterhin kann ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid und/oder ein erfindungsgemäßer Antikörper in Form von systemisch eingesetzten Arzneimitteln verwendet werden. Dazu gehören die Parenteralia, zu denen die Injektabilia und Infusionen gehören. Injektabilia werden entweder in Form von Ampullen oder auch als sog. gebrauchsfertige Injektabilia, z.B. als Fertigspritzen oder Einmalspritzen, daneben auch in Durchstechflaschen zur mehrmaligen Entnahme hergerichtet. Die Verabreichung der Injektabilia kann in Form der subkutanen (s.c.), intramuskulären (i.m.), intravenösen (i.v.) oder intrakutanen (i.c.) Applikation erfolgen. Insbesondere können die jeweils zweckmäßigen Injektionsformen als Kristallsuspensionen, Lösungen, nanopartikuläre oder kolloiddisperse Systeme, wie z.B. Hydrosole, hergestellt werden.

Die injizierbaren Zubereitungen können ferner als Konzentrate hergestellt werden, die mit wässrigen isotonischen Verdünnungsmitteln aufgelöst oder dispergiert werden. Die Infusio-

nen lassen sich ebenfalls in Form von isotonischen Lösungen, Fettemulsionen, Liposomenzubereitungen, Mikroemulsionen, zubereiten. Wie Injektabilia können auch Infusionszubereitungen in Form von Konzentraten zum Verdünnen zubereitet werden. Die injizierbaren Zubereitungen können auch in Form von Dauerinfusionen sowohl in der stationären als auch in der ambulanten Therapie, z.B. in Form von Minipumpen, appliziert werden.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, erfindungsgemäße Polypeptid, erfindungsgemäße Oligonukleotid oder ein erfindungsgemäßer Antikörper kann in den Parenteralia an Microcarrier oder Nanopartikel gebunden sein, beispielsweise an feinstverteilte Partikel auf Basis von Poly(meth)acrylaten, Polylactaten, Polyglycolaten, Polyaminsäuren oder Polyetherurethanen. Die parenteralen Zubereitungen können auch als Depotpräparate modifiziert sein, z.B. aufbauend auf dem "Multiple Unit Prinzip", wenn ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder ein erfindungsgemäßer Antikörper in feinst verteilter bzw. dispergierte, suspendierter Form oder als Kristallsuspension eingearbeitet ist oder aufbauend auf dem "Single Unit Prinzip", wenn ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder ein erfindungsgemäßer Antikörper eingeschlossen ist in einer Arzneiform, z.B. ein Tablette oder ein Stäbchen, das anschließend implantiert wird. Häufig bestehen diese Implantate oder Depotarzneimittel bei Single Unit und Multiple Unit Arzneiformen aus sogenannten bioabbaubaren Polymeren, wie z.B. Polyester der Milch- und Glykolsäure, Polyetherurethanen, Polyaminosäuren, Poly(meth)acrylaten oder Polysacchariden.

Als Hilfs- und Trägerstoffe bei der Herstellung von Parenteralia kommen Aqua sterilisata, den pH-Wert beeinflussende Substanzen, wie z.B. organische und anorganische Säuren und Basen sowie deren Salze, Puffersubstanzen zur Einstellung des pH-Wertes, Isotonisierungsmittel, wie z.B. Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Glucose und Fructose, Tenside bzw. oberflächenaktive Substanzen und Emulgatoren, wie z.B. Partialfettsäureester des Polyoxyethylensorbitans (Tween®) oder z.B. Fettsäureester des Polyoxyethylens (Cremophor®), fette Öle, wie z.B. Erdnussöl, Sojabohnenöl und Rizinusöl, synthetische Fettsäureester, wie z.B. Ethyloleat, Isopropylmyristat und Neutralöl (Miglyol®), sowie polymere Hilfsstoffe wie z.B. Gelatine, Dextran, Polyvinylpyrrolidon, von die Löslichkeit erhöhenden Zusätzen organischer Lösungsmittel wie z.B. Propylenglycol, Ethanol, N,N-Dimethylacetamid, Propylenglycol oder komplexbildender Stoffe, wie z.B. Citraten und Harnstoff, Konservie-

rungsmittel, wie z.B. Benzoesäurehydroxypropyl- und -methylester, Benzylalkohol, Antioxidantien, wie z.B. Natriumsulfit und Stabilisatoren, wie z.B. EDTA, in Betracht.

Bei Suspensionen erfolgt ein Zusatz von Verdickungsmitteln zum Verbindern des Absetzens von erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, erfindungsgemäßen Polypeptiden, erfindungsgemäßen Oligonukleotiden oder einem erfindungsgemäßen Antikörper von Tensiden und Peptisatoren, um die Aufschüttelbarkeit des Sediments zu sichern, oder von Komplexbildnern wie EDTA. Es lassen sich auch mit verschiedenen Polymeren Wirkstoffkomplexe erzielen, beispielweise mit Polyethylenglykolen, Polystyrol, Carboxymethylcellulose, Pluronic® oder Polyethylenglykolsorbitfettsäureestern. Zur Herstellung von Lyophilisaten werden Gerüstbildner, wie z.B. Mannit, Dextran, Saccharose, Humanalbumin, Lactose, PVP oder Gelatinesorten verwendet.

Die jeweils geeigneten Arzneiformen lassen sich in Einklang mit dem Fachmann bekannten Rezepturvorschriften und Verfahrensweisen auf der Basis pharmazeutisch-physikalischer Grundlagen herstellen.

Ein letzter Aspekt betrifft die Verabreichung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotide bei der Gentherapie mittels herkömmlicher Transfektionssystem, wie zum Beispiel Liposomen oder „particle gun“-Techniken, wie oben bereits beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder einem anderen erfindungsgemäßen Genkonstrukt transformiert ist. Wirtszellen können sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Zellen sein, Beispiele für prokaryontische Wirtszellen sind *E. coli* und für eukaryontische Zellen *Saccharomyces cerevisiae* oder Insektenzellen. Weitere brauchbare Zellen und Organismen sind bereits oben beschrieben.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann eine diagnostische Zusammensetzung, umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder einen erfindungsgemäßen Antikörper. Die erfindungsgemäße diagnostische Zusammensetzung kann auch als Bestandteil eines diagnostischen Kits der Erfindung vorliegen (siehe unten).

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren zur Diagnose von tumoralen Erkrankungen, umfassend den Schritt von Bestimmen der Expression der Expression von 7a5/Prognostin in einer biologischen Probe aus einem erkrankten Gewebe und Vergleich der Expression mit der Expression von 7a5/Prognostin in einem gesunden Gewebe. Bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren, bei dem die Bestimmung der Expression von 7a5/Prognostin eine Hybridisierung, eine PCR, eine „real time“ (RT)-PCR, eine Antigen-Antikörper Bindung, einen ELISA, eine optische Proteom-Analyse, eine ein- oder mehrdimensionale Gelelektrophorese, eine massenspektrometrische Analyse, eine Chromatographie, eine Sequenzierung, Methylierungsanalyse, SNP-Bestimmung oder Kombinationen dieser Verfahren umfaßt.

So stellt die vorliegende Erfindung die Etablierung, und Aufwendung des transkriptionellen Expressionsnachweises von 7a5/Prognostin unter Verwendung u.a. der real time RT-PCR zur Verfügung. Beispielhaft wurde die Expressionshöhe von 7a5/Prognostin in der unbekannten Probe (z.B. Tumor-RNA) als Prozent der 7a5/Prognostin-Expression in der kommerziell verfügbaren, humanen Kolonkarzinom-Kalibrator-Zelllinie SW620 ermittelt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren zur Diagnose von tumorösen Erkrankungen, wobei die tumoröse Erkrankung metastasierender Kolonkrebs ist. Aus dem oben genannten ergibt sich ein prognostischer Wert der auf den oben genannten Wegen generierten 7a5/Prognostin-Expressionshöhen als klinische Parameter. Es gibt bisher keine Beschreibung von Korrelationen der Expressionen der 7a5/Prognostin-Transkripte mit klinischem Parametern wie Metastasierung und/oder Rezidiv-freies bzw. generelles Überleben. So führte in in vitro-Systemen die Transfektion der 7a5/Prognostin-cDNA zu erhöhtem Wachstum und zu gesteigerter Migration der humanen Kolonkarzinomzellen. In in vivo-Experimenten wurden sowohl im subkutanen als auch im orthotopen Tiermodell erhöhte Wachstumcharakteristika der transfizierten Zellklone gemessen. Im orthotopen Modell kam es darüber hinaus zur Bildung von Metastasen in der Leber. Die Korrelation der Expressionen der 7a5/Prognostin-Transkripte insbesondere mit der Prognose für die Fernmetastasierung der Kolonkarzinome war bisher unbekannt und ist überraschend.

Erfindungsgemäß kann eine zu untersuchende biologische Probe aus einer Tumorbiopsie aus Darm, Leber, Lymphknoten, Lunge, Knochen oder Hirn abgeleitet sein. Es sind aber auch andere biologische Proben, wie Speichel, Urin, Blut oder Teile davon möglich.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen, umfassend eine Modulation der Expression von 7a5/Prognostin. Die Erfindung betrifft die Korrelation der (u.a. transkriptionellen) Expressionshöhe von 7a5/Prognostin mit der Organspezifität der Metastasierung, sowie der Fernmetastasierungswahrscheinlichkeit von u.a. Kolonkarzinomen. Damit ist die potentielle Nutzung dieses neuen Gens als Markergen für Tumordiagnostik und, darüber hinaus, als Interventionsstarget auch für Tumorthherapie zur Beeinflussung (Verhinderung) der Fernmetastasierung beim u.a. Kolonkarzinom gegeben. Erfindungsgemäß kann eine Beeinflussung zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen die Verabreichung einer erfindungsgemäßen wie oben angegebenen pharmazeutischen Zusammensetzung umfassen. Ein weiterer besonderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen, wobei die tumoröse Erkrankung metastasierender Kolonkrebs ist.

Die Identifizierung der Rolle von 7a5/Prognostin bei der Metastasierung in tumorösen Erkrankungen stellt in einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung die Möglichkeit der Verwendung von 7a5/Prognostin als ein „Target“ für ein Verfahren zur Auffindung von Substanzen, die an 7a5/Prognostin binden, zur Verfügung. Erfindungsgemäß umfaßt dieses Verfahren ein in Kontakt bringen einer Zelle, die 7a5/Prognostin exprimiert (zum Beispiel einer rekombinanten Zelle wie oben) mit einer Kandidaten-Substanz, Nachweisen der Anwesenheit der Kandidaten-Substanz, die an 7a5/Prognostin bindet, und Bestimmen, ob die Kandidaten-Substanz auch an 7a5/Prognostin bindet. Verfahren zur routinemäßigen Durchführung solcher Screenings sind dem Fachmann im Stand der Technik der Pharmazie gut bekannt. Mittels „High-Throughput-Technologien“ können geeignete Substanzbibliotheken durchsucht werden. Diese Bibliotheken und ihre Durchsuchung sind dem Fachmann bekannt und leicht an die Gegebenheiten der vorliegenden Erfindung anzupassen, ohn dabei erfinderisch tätig sein zu müssen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die Schritte des oben genannten Screening-Verfahrens und geeignetes Formulieren der in Schritt c) identifizierten Substanz in eine pharmazeutisch akzeptable Form.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, eines erfindungsgemäßen Polypeptids, eines erfindungsgemäßen Oligonukleotids oder eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur Diagnose und/oder zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen. Dazu sind oben Aspekte bereits ausgeführt. Weiter kann anhand von Untersuchungen der Expressionsveränderungen des 7a5/Prognostins eines Patienten auch die Pharmakokinetik des verwendeten Therapeutikums zur Behandlung bestimmt werden, und so die Parameter der Behandlung geeignet modifiziert werden (wobei auch andere bekannte Parameter dem Fachmann bekannt sind). Dieser Aspekt ist ebenfalls als „personalized medicine“ bekannt. Des weiteren können auch Linker für die bildgebende Diagnostik oder Therapie an erfindungsgemäße Gegenstände angebracht werden (molecular imaging, targeted therapy). Diese Linker sind dem Fachmann bekannt, z.B. aus Trail PA, King HD, Dubowchik GM. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. Cancer Immunol Immunother. 2003 May;52(5):328-37. Epub 2003 Jan 16.; Signore A, Annovazzi A, Chianelli M, Corsetti F, Van de Wiele C, Watherhouse RN. Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. Eur J Nucl Med. 2001 Oct;28(10):1555-65. Epub 2001 Jul 31. Erratum in: Eur J Nucl Med 2001 Nov;28(11):1737.; und Mehvar R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. J Control Release. 2000 Oct 3;69(1):1-25.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz als Marker für humane Erbkrankheiten. Dazu wird die Sequenz des 7a5/Prognostins auf spezifische Mutationen (z.B. SNPs oder andere Punktmutationen) hin untersucht, die dann unterschiedliche Präferenzen für eine Metastasierung bewirken könnten. Auch kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder erfindungsgemäßes Oligonukleotid zur Gentherapie verwendet werden. Aspekte dazu sind bereits oben ausgeführt und schließen siRNA und/oder antisense-Techniken ein.

Zuletzt umfaßt die vorliegende Erfindung auch einen diagnostischen Kit, der eine diagnostische Zusammensetzung wie oben ausgeführt, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Puffern und/oder Gebrauchsanweisungen umfaßt. In einer Ausführungsform liegt der erfindungsgemäße diagnostische Kit in Form eines PCR-, insbesondere RT-PCR-, oder ELISA-Kits vor. Ein Beispiel eines solchen Kits für die real time RT-PCR wäre z.B. mit den durch die Erfinder designten Primern und Sonden für den transkriptionellen Expressionsnachweis von 7a5/Prognostin zusammen mit allen Agenzien für die real time RT-PCR. Darüber hinaus

wurde durch die Erfinder ein reproduzierbares und einfach handhabbares Arbeitsprotokoll erstellt. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Einbeziehung von 7a5/Prognostin (unter Anwendung aller Technik-üblichen Kontrollen) in die DNA-Chip-Technologie; sowohl in DNA-Chips, die, jeweils aktualisiert, "alle" bekannten Gene erfassen, als auch insbesondere in solche, die Themen-relevant spezifische Gene z.B. definierter Tumorentitäten, Signaltransduktionskaskaden etc. beinhalten.

Die Verwendung des Nachweises der Expression des hier beschriebenen, neu identifizierten Gens 7a5/Prognostin im Primärtumor von Kolonkarzinom-Patienten ist unter anderem mit der Fernmetastasierung (z.B. in Leber und Lunge) korreliert. Die Erfinder haben durch vergleichende Expressionsanalyse in humanen Primärtumoren, Metastasen unterschiedlicher Zielorgane und in den korrespondierenden Normalgeweben von Kolonkarzinom-Patienten das neue Gen 7a5/Prognostin identifiziert, Es ist auf Chromosom 7 des humanen Genoms lokalisiert.

Die transkriptionelle Expression von 7a5/Prognostin ist überraschenderweise a) in malignen Geweben (Primärtumoren, Metastasen) höher als in den korrespondierenden Normalgeweben, b) in den Fernmetastasen der Kolonkarzinome, z.B. in Leber und Lunge, höher als im korrespondierenden Primärtumor, c) vor allem höher in den Primärtumoren, die bereits metastasiert haben oder im Verlauf der Erkrankung noch manifest metastasieren werden, im Vergleich zu den Primärtumoren, die nicht metastasieren.

Da die hier vorgestellte Erfindung eines Verfahrens zur Fernmetastasierungsprognose für Kolonkarzinom-Patienten basierend auf dem transkriptionellen Nachweis des neuen Gens 7a5/Prognostin eine zentrale klinische Frage berührt, kann ein Interesse an dieser Erfindung ohne Einschränkung für alle onkologischen Kliniken und Forschungsinstitute weltweit gelten.

Insbesondere stellt die Erfindung folgende Vorteile zur Verfügung

- a) die Sequenz der neu identifizierten 7a5/Prognostin-cDNA sowie der putativen Proteinsequenz, wobei charakteristische Interaktionsdomänen markiert sind (Figur 3).
- b) in *in vitro*-Systemen führte die Transfektion der 7a5/Prognostin-cDNA zu erhöhtem Wachstum und zu gesteigerter Migration der humanen Kolonkarzinomzellen.
- c) in *in vivo*-Experimenten wurden sowohl im subkutanen als auch im orthotopen Tiermodell erhöhte Wachstumscharakteristika der transfizierten Zellklone gemessen. Im orthotopen Modell kam es darüber hinaus zur Bildung von Metastasen in der Leber.

- d) Messung der relativen 7a5/Prognostin-mRNA-Expression in Primärtumoren, Metastasen sowie korrespondierenden Normalgeweben in Patienten mit Kolonkarzinomen.
- e) Messung der relativen 7a5/Prognostin-mRNA-Expression in Primärtumoren von Patienten mit Kolonkarzinomen.

Da sich die Verwendung der real time RT-PCR zunehmend zur "state of the art"-Methode der transkriptionellen Expressionsanalytik entwickelt, können die apparativen Voraussetzungen zur Anwendung der Erfindung zunehmend in den Laboratorien weltweit vorausgesetzt werden.

Die Erfindung soll nun im folgenden unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren und Sequenzen weiter beispielhaft erläutert werden, in denen

Figur 1 die relative 7a5/Prognostin-mRNA-Expression in Primärtumoren von Patienten mit Kolonkarzinomen; Rezidiv-freies Überleben zeigt,

Figur 2 die relative 7a5/Prognostin-mRNA-Expression in Primärtumoren von Patienten mit Kolonkarzinomen; Entwicklung von Metastasen zeigt, und

Figur 3 die Sequenz der neu identifizierten 7a5/Prognostin-cDNA sowie der putativen Proteinsequenz zeigt; charakteristische Interaktionsdomänen sind markiert.

SEQ ID No. 1 die cDNA Sequenz von 7a5/Prognostin zeigt,

SEQ ID No. 2 die Proteinsequenz von 7a5/Prognostin zeigt, und

SEQ ID No. 3 bis SEQ ID No. 6 in den Beispielen verwendete Oligonukleotide zeigt.

Beispiele

Beispiel 1: Metastasierungsprognose unter Verwendung des 7a5/Prognostin-mRNA-Expressionsniveaus (real time RT-PCR)

Patienten und menschliche Gewebe

51 Patienten (mit 150 Geweben) traten in diese Studie ein, die mit informierter Zustimmung der Patienten durchgeführt wurde. Die Mensch-primären Kolontumore (41 Proben von 39

Patienten), Metastasen (52 Proben von 41 Patienten) und normalen Geweben (37 Mucosaproben, 18 Lebergewebe, 1 Lungengewebe, und 1 Lymphknoten; von 40 Patienten) wurden in flüssigem Stickstoff perioperativ schockgefroren und bei -80°C für weitere Analysen in der Tumor Bank der Robert-Rössle-Klinik, Berlin gelagert. Der TNM Status wurde durch Pathologen der Robert-Rössle-Klinik bestimmt.

Mikrodissektion und RNA Isolierung

Serielle Kryoschnitte jedes Gewebes wurden für die RNA Isolierung (10µm) und Immunohistochemie (5µm) hergestellt. Für die Mikrodissektion von Tumour-Zellpopulationen, wurde jeder zehnte Kryoschnitt pro Gewebe durch einen Pathologen nach Färbung mit Hämalaun evaluiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde aus Mikrodissektions-Zellpopulationen, unter der Verwendung eines DNase Inkubations-Schrittes (High Pure RNA Tissue Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE) durchgeführt. Die RNA Konzentrationen wurden in a Microplatten Fluoreszenz-Lesegerät (RiboGreen RNA Quantitation Kit, Molecular Probes via MoBiTec, Göttingen, DE) gemessen und wurden in zweifachen Ansätzen aus den ribosomalen RNA-Eichkurven (EasySoftG200/Easy-Fit Software, SLT-Labinstruments, Crailsheim, DE) berechnet. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Tumorzelllinien wurde unter der Verwendung von Trizol Reagenz (Invitrogen) durchgeführt.

Differential Display RT-PCR

Differential Display RT-PCR wurde unter der Verwendung des RNAimage Differential Display Systems 3 (GenHunter Corp., Nashville, TN) durchgeführt. Jeder der drei zur Verfügung gestellten eine Base-verankerten Primer wurde für die reverse Transkription von 200 ng von Gesamt-RNA pro Reaktion verwendet, gemäß den Anweisungen des Herstellers. Differential display PCR wurde unter Befolgung des empfohlenen Protokolls durchgeführt, wobei α -[³³P]dATP (NEN Life Science, Zaventum, Belgium) als Marker und AmpliTaq Polymerase (Applied Biosystems, Weiterstadt, DE) verwendet wurden. Die PCR-Produkte wurden in einem 5% Polyacrylamidgel getrennt. Das Gel wurde geblottet, getrocknet und über Nacht gegenüber Röntgenfilm ausgesetzt (Kodak BioMax MR, via Sigma, Deisenhofen, DE). Der Film wurde wieder an das Gel angepaßt, um ein Ausschneiden der Banden zu ermöglichen, die verschiedene Expression zeigten. Diese cDNA-Fragmente wurden durch PCR unter der Verwendung derselben Primerkombinationen und PCR Bedingungen wie für differential Display RT-PCR reamplifiziert, und in den pCR2.1 Vektor (was zu den hier beschriebenen Kon-

strukturen führte: pCR2.1/7a3, pCR2.1/7a5, pCR2.1/7a10, Original TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert.

Überprüfung von cDNA Fragment-enthaltenden Konstrukten

Die pCR2.1 Konstrukte (hier beschrieben: pCR2.1/7a3, pCR2.1/7a5, pCR2.1/7a10) wurden unter der Verwendung eines Minifold II Slotblot Apparates (Schleicher & Schuell, Dassel, DE) jedes auf fünf Nylonmembranen unter der Verwendung eines Minifold II Slotblot Apparates (Schleicher & Schuell, Dassel, DE) geblottet. Jede Membran wurde mit vollständigen differential Display RT-PCR Produkten, die aus einem spezifischen Gewebetyp erzeugt wurden (Consalez et al. 1996), hybridisiert. Um eine hohe spezifische Aktivität zu erreichen, wurden die differential Display RT-PCR Produkte mit α -[32 P]dCTP (NEN) neu markiert (Random Primed Labeling Kit, Roche Diagnostics), und wurden gereinigt (Nucleotide Removal Kit, QIAGEN, Hilden, DE). Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C (6x SSC, 5x Denhardt's Reagenz, 0.5% SDS, 100µg/ml gescherter DNA) durchgeführt. Die Blots wurden gegenüber Röntgenfilm ausgesetzt (Kodak Xomat-AR). Die Inserts von Konstrukten die ein ähnliches Expressionsmuster zeigten, wie es in der differential Display RT-PCR gefunden wurde, wurden sequenziert (Invitex, Berlin, DE).

cDNA Bibliotheks-Screening

Die SW480 Zelllinien-abgeleitete menschliche Kolorektale Adenocarcinom STRETCH PLUS cDNA library (Clontech, Heidelberg, DE) wurde in den bakteriellen Wirtstamm Y1090 r⁻ transfiziert. Zweifache Filter-Replikas wurden unter der Verwendung von Optitran verstärkte Cellulosenitrat Membranen (Schleicher & Schuell) erzeugt. Die Filter wurden denaturiert (0.5N NaOH, 1M NaCl) und neutralisiert (0.5M Tris pH 8, 1M NaCl). Das Konstrukt pCR2.1/7a5 wurde mit α -[32 P]dCTP (NEN) unter der Verwendung des Random Primed Labeling Kit (Roche Diagnostics) markiert als Sonde verwendet. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C (5x SSC, 5x Denhardt's Reagenz, 0.1% SDS, 100µg/ml gescherte DNA) durchgeführt. Die Filter wurden dann gegenüber Röntgenfilm exponiert (Kodak Xomat-AR). Positive Plaques wurden gepickt. Die DNA Präparation wurde unter der Verwendung des Lambda-DNA Präparations Kit (QIAGEN) durchgeführt. Die cDNA Inserts wurden sequenziert (Invitex).

Verlängerung der Sequenzinformation

Durch differential Display RT-PCR und cDNA library Screening erhaltene Sequenzen wurden für die Datenbankanalysen verwendet, die alle unter der Verwendung des WWW²HUSAR Analyse Pakets auf dem Server der Biocomputing Service Gruppe des DKFZ in Heidelberg (<http://genius.embnnet.dkfz-heidelberg.de>). Ein EST Cluster wurde bestimmt, der Sequenzidentität zeigte, lokalisiert auf dem genomischen DNA Sequenzfragment AC007001. In der 5'-Richtung wurden drei weitere EST Cluster lokalisiert. EST-verbindende RT-PCR wurde durchgeführt (GeneAmp RNA PCR Kit, Applied Biosystems) um zu überprüfen, ob die identifizierten EST Cluster Teil der 7a5-cDNA sind. Unter der Verwendung der neuen Sequenzinformation und der cDNA Sequenz von SH3BP4, die Sequenzähnlichkeiten in überlappenden Regionen zeigte, wurden EST Cluster identifiziert, die auf dem genomischen DNA Sequenzfragment AC005083 lokalisiert waren. Long-distance RT-PCR (reverse Transkription: Expand Reverse Transkriptase; PCR: Expand High Fidelity PCR, beide Roche Diagnostics) wurde durchgeführt um zu überprüfen, ob die identifizierten ESTs Teile der 7a5-cDNA waren.

5'-RACE

5'-RACE wurde durchgeführt, wobei der SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. Agarosegel-getrennte PCR Produkte wurden re-amplifiziert und in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen) für die Sequenzierung kloniert.

Klonierung des ORF in einen Expressionsvektor

Long distance RT-PCR wurde wie oben durchgeführt, wobei jedoch Primer für die Amplifikation des gesamten ORF ohne Stopcodon verwendet wurden. Der Primer am 5'-Ende war so aufgebaut, um eine gerichtete Klonierung des ORF in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO Vektor (pcDNA3.1Directional TOPO Expression Kit, Invitrogen), im Hinblick auf den richtigen Rahmen zu ermöglichen. Das Klonierungsverfahren wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Konstrukte (pcDNA3.1D/7a5-V5-His), die das erwartete Insert enthielten, wurden sequenziert.

Erzeugung von stabil transduzierten 7a5 exprimierenden SW480 Zellklonen

Um die biologische Funktion des 7a5 Gens zu analysieren, wurden das 7a5- exprimierende pcDNA3.1D/7a5-V5-His Konstrukt und das LacZ-exprimierende pcDNA3.1D/V5-His/lacZ

Konstrukt (Invitrogen, diente als Kontrolle) in SW480 Zellen unter der Verwendung von Lipofectin (Invitrogen) gemäß den Anweisungen des Herstellers transduziert. Für die Transduktion, wurden 10µg Plasmid DNA und 15µg Lipofectin verwendet, um 5×10^4 Zellen zu transduzieren. 48h nach Transduktion wurden Konstrukt-tragende Klone in G418 (Invitrogen) enthaltendem Medium selektiert. Nach zwei Wochen waren Kolonien sichtbar, die dann für weitere Experimente ring-kloniert und expandiert wurden. Alle isolierten Zellklone wurden durch Western Blots auf 7a5 oder LacZ Expression gescreent.

Western Blots von 7a5-exprimierenden SW480 Zellklonen

7a5-transduzierte, lacZ- transduzierte und Wildtyp SW480 Zellen wurden in 1% SDS, 10mM Tris-HCl, 2mM EDTA lysiert und in einem 7.5% Polyacrylamidgel getrennt. Nach Elektrophoretik (1 h, Trans Blot - Semi Dry Transfer Cell, BioRad, Munich, DE) wurde exprimiertes 7a5 Protein unter der Verwendung eines anti-V5 Antikörpers (Invitrogen) und einem sekundären anti-Maus-HRP Antikörper (Promega, Madison, WI) nachgewiesen. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde mit ECL Lösung (Amersham Biosciences, Freiburg, DE) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt

Relative quantitative zwei-Schritt real time RT-PCR

Reverse Transkriptase Reaktion (RT) wurde mit 50 ng an Gesamt-RNA (MuLV Reverse Transkriptase, Applied Biosystems) durchgeführt. Für jede quantitative real time PCR (95°C für 60 Sekunden, 45 Zyklen von 95°C 10 Sekunden, 60°C 10 Sekunden, 72°C 20 Sekunden), 1/5 des RT Volumens wurde durch die Verwendung des LightCycler (LightCycler DNA Master Hybridization Probes kit, Roche Diagnostics) abgenommen. Die Expression von 7a5 und des Haus-keeping-Gens Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) wurden in zweifachen Ansätzen aus der selben RT-Reaktion bestimmt. Für 7a5 wurde ein 136 bp Amplikon und für G6PDH ein 136 bp Amplikon durch Primer hergestellt, die durch Gen-spezifische Fluoreszin- und LCRed640-markiert Hybridisierungssonden (Synthese von Primern und Sonden: BioTeZ und TIB MolBiol, beide Berlin, DE) erkannt wurden. Die Kalibrator cDNA wurde in seriellen Verdünnungen gleichzeitig in jedem Lauf verwendet, abgeleitet von der Zelllinie Colo205.

Zum Nachweis von menschlichen Zellen SW620 Klontumoren in Mausleber nach orthotoper Transplantation wurde eine menschliche Satelliten Sequenz verwendet. Primer (Synthese BioTeZ, Berlin), die ein Amplikon erzeugten, wurden verwendet (ähnlich zu Becker et al.,

2002) (Synthese TIB MolBiol, Berlin). Real time PCR wurde wie oben beschrieben unter der Verwendung von 250 ng der genomischen DNA durchgeführt.

Primer:

vorwärts: 5' - ttc ttt tga ttc ctc cgg tga - 3' (SEQ ID No. 3)

reverse: 5' - act ctg atg ggc atg tgc tg - 3' (SEQ ID No. 4)

Sonden (hier für Anwendung am Light Cycler):

5'- gca gac ttc ctc aag aaa ttc tgg aag atc ta - 3' – FITC (SEQ ID No. 5)

LCRed - 5'- agt gtt tca gaa ctt ctg gac att tta gac ga – 3' (SEQ ID No. 6)

Annealing-Temperatur: 60°C; Cyclenanzahl: 45

Soft Agar Wachstum von 7a5 transduzierten SW480 Tumorzellklonen

Zur Evaluierung von Zellwachstum in Soft Agar, wurden 5ml von auf 50°C vorgewärmtem 1% Agar (Difco, Detroit, MI) mit 5ml DMEM Medium gemischt (doppelt konzentriert w/o Phenolrot, Invitrogen), ergänzt mit 10% FCS und Antibiotika. 200µl Zellsuspension, die 5×10^4 Zellen enthielt wurden schnell zu den 10ml von Soft Agar Gemisch hinzugefügt, kräftig gemischt, in 5ml Aliquots in 60 mm Petrischalen gegossen und für 5 Minuten auf Eis plaziert. Dann wurden die 7a5-transduzierten Zellklone # 10, #13 und #16, die lacZ- transduzierten Zellklone und Wildtyp SW480 Zellen wurden in zweifachen Ansätzen in Soft Agar für 8 Tage angezogen und Kolonien wurden gezählt.

Zellmigrations-Test

Transwell Membrankammern (Porengröße 12,0µm, Costar, Heidelberg, DE) wurden mit 1ml RPMI 1640 Medium equilibriert, das mit 10% FCS für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ ergänzt war. Dann wurde das Medium entfernt und 0,5ml Zellsuspension, die $2,5 \times 10^5$ Zellen enthielt wurde zu den Filter-Membrankammern hinzugefügt und 1,5ml Medium wurden zu der unteren Kammer hinzugefügt. Die Zahl von Zellen, die durch die Membran zu der unteren Kammer wanderten wurde gezählt nach 24 h nach Zellinokulation (in dreifachen Ansätzen durchgeführt).

In vivo Wachstum von 7a5 transduzierten SW480 Zellklonen: subkutane Transplantation

Für in vivo Tumorwachstum wurden 1×10^7 7a5-transduzierte (Klone #10, #13, #16), LacZ-transduzierte oder Wildtyp SW480 Zellen subkutan entlang der linken Flanke von 6 - 8 Wochen alten männlichen NMRI nu/nu Mäusen an Tag 0 transplantiert. Jede Tiergruppe bestand aus 10 Tieren. Die Tiere wurden für 39 Tage gehalten (außer Zellklon 7a5 #10-transduzierte Tumor-tragende Mäuse: 35 Tage; Tod einer Maus in dieser Gruppe), um die Entwicklung von meßbaren Tumoren zu ermöglichen. Die Tumorgröße wurde in allen Gruppen in zwei Dimensionen an Tagen 7, 11, 15, 21, 27, 32, 35 und 39 gemessen. Die Tumorumfänge wurden berechnet ($\text{Breite}^2 \times \text{Länge} / 2$) und als mittleres Tumor-Volumen in cm^3 angegeben. Die Tiere wurden getötet und Tumore wurden entfernt und in flüssigem Stickstoff für weitere Analysen schockgefroren.

In vivo Wachstum von 7a5 transduzierten SW480 Zellklonen: orthotope Transplantation

1×10^7 7a5-transduzierte (Klone #10, #13, #16), LacZ-transduzierte oder Wildtyp SW480 Zellen wurden zuerst subkutan entlang der linken Flanke von 6 - 8 Wochen alten weiblichen SCID-beige Mäusen transplantiert, und für drei Wochen wachsen gelassen. Dann wurden diese Tumore entnommen, in $2 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ große Stücke geschnitten und wurden orthotop in das Caecum von weiblichen SCID-beigen Mäusen transplantiert. Jede Tiergruppe bestand aus 5 Tieren. Die Tiere wurden für 70 Tage gehalten to allow for the development of tumors and potential generation of metastases. Starting at day 16, wurde die Tumorgröße in allen Gruppen einmal die Woche gemessen. Die Tiere wurden getötet und Tumore sowie potentiell metastatische Organe wurden entfernt und in flüssigem Stickstoff für weitere Analysen schockgefroren. After Entnahme wurden die finalen Tumorumfänge Länge x Breite x Höhe berechnet und als mittleres Tumor-Volumen in cm^3 angegeben.

In situ Hybridisierung in menschlichem Gewebe

Das 7a5-spezifische differential Display RT-PCR Fragment wurde via pCR2.1/7a5 für Klonierung in den pBluescript II SK+ Vektor (Stratagene GmbH, Heidelberg, DE) übertragen. Die *in vitro* Transkription wurde unter der Verwendung von T7 und SP6 RNA Polymerasen (Epicentre Technologies, Madison, Sonden durchgeführt, WI) um sense und antisense Sonden zu erhalten. Die Transkription wurde unter der Verwendung des DIG Labeling Kit (Roche Diagnostics) durchgeführt.

Kryoschnitte von menschlichem Gewebe wurden in Paraformaldehyd fixiert und getrocknet. Die Prähybridisierung wurde für eine Stunde bei 55°C unter der Verwendung von 4x SSC, 5% Dextransulfat, 1x Denhardt's Reagenz, 50% Formamid, 0,25mg/ml Hefe-tRNA und 0,5mg/ml fragmentierter Lachssperma DNA durchgeführt. Die Hybridisierungsreaktion wurde für 16 Stunden bei 55 °C, unter der Verwendung der Prähybridisierungslösung durchgeführt, die 500 ng/ml der *in vitro*-transkribierten RNA Sonde enthielt. Extensives Waschen wurde in 2x SSC, 50% Formamid bei 55°C durchgeführt. Blocking wurde unter der Verwendung von Blocking Reagenz (Roche Diagnostics) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Schnitte wurden für zwei Stunden mit Anti-DIG-AP Fab Fragmenten (Roche Diagnostics) inkubiert. Nach Waschen wurde ein kolorimetrischer Nachweis unter der Verwendung von NBT/BCIP Lösung (Roche Diagnostics) durch Inkubation im Dunklen durchgeführt.

Immunohistochemie

Kryoschnitte von primären Tumoren, Lymphknoten, Lungen- und Leber-Metastasen sowie aus normalen entsprechenden Geweben wurden gemäß einer Modifikation der DAKO Katalysierten Signal Amplifikation (CSA) System (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) immungefärbt: Endogene Biotin Reaktivität wurde mittels einer UVC-Bestrahlung bei 254 nm für 35 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurden in einer wäßrigen 0,01% NaN₃ Stabilisator-Lösung für 30 Minuten bei 50°C rehydriert. Endogene Peroxidase wurde durch Inkubation mit 3% H₂O₂ in Methanol für 30 Minuten bei 50°C blockiert. Der Protein Block wurde für 5 Minuten wie empfohlen durchgeführt.

Der primäre polyklonale Kaninchen-anti-Mensch 7a5 Antikörper wurde gegen ein 7a5-derived Polypeptid (AA 812 – 826 nahe dem C-Terminus lokalisiert: (KLH)-SALDRMKNPVTKHWR, Eurogentec, Seraing, Belgium) erzeugt und wurde anschließend durch Affinitäts-Chromatographie auf dem Peptidantigen, gekoppelt an CNBr-Sepharose (BioGenes, Berlin, DE), gereinigt. Dieser Antikörper wurde für die Immunohistochemie in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Um die nicht-spezifische Antikörper-basierte Fc-Rezeptorligation zu vermeiden, ein Fc-depletierter biotinylierter affini-reiner F(ab')₂ Fragment-Antikörper mit anti-Kaninchen Spezifität (Verdünnung 1:40.000, Dianova-Jackson Immuno-Research, Hamburg, DE) wurde verwendet. Die Streptavidin-HRP wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur angewendet. Kolorimetrischer Nachweis wurde unter der Verwendung von

DAB Substrat durchgeführt, wobei dem Protokoll des Hersteller gefolgt wurde. Nuclei wurden mit Hämatoxylin für 1 Minute gegengefärbt. Die Schnitte wurden gemäß topographischer Expressionsaspekte analysiert.

Statistische Analyse

Das Ausmaß an statistischer Signifikanz wurden unter der Verwendung des nicht-parametrischen zwei-seitigen Mann-Whitney Rank Summen Tests (real-time RT-PCR) berechnet, und dem zwei-unabhängige Proben T-Test (Soft Agar Wachstum, Zellmigrationstest, in vivo Wachstum).

Patentansprüche

1. Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid von 7a5/Prognostin kodiert, ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No: 1 angegebenen Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID No: 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz ableiten,
 - c) Derivate der in SEQ ID No: 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz, die für die Polypeptide mit der in SEQ ID No: 2 angegebenen Aminosäuresequenz kodieren und mindestens 80% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist,
 - d) einer humanen genomischen Nukleinsäuresequenz, welche das Gen für 7a5/Prognostin umfaßt und Polymorphismen aufweist.
2. 7a5/Prognostin-Polypeptid, kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, insbesondere nach SEQ ID No: 2.
3. Oligonukleotid, das spezifisch an eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 hybridisiert.
4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, Polypeptid nach Anspruch 2 oder Oligonukleotid nach Anspruch 3 zur Behandlung von Erkrankungen.
5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1.
6. Rekombinanter prokaryontischer oder eukaryontischer Wirtsorganismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 5.
7. Polyklonaler oder monoklonaler Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon, der ein 7a5/Prognostin-Polypeptid, insbesondere nach SEQ ID No: 2, erkennt.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, ein Polypeptid nach Anspruch 2, ein Oligonukleotid nach Anspruch 3 oder einen Antikörper nach Anspruch 7, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger.
9. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, ein Polypeptid nach Anspruch 2, ein Oligonukleotid nach Anspruch 3 oder einen Antikörper nach Anspruch 7.
10. Verfahren zur Diagnose von tumoralen Erkrankungen, umfassend den Schritt von Bestimmen der Expression der Expression von 7a5/Prognostin in einer biologischen Probe aus einem erkrankten Gewebe oder Körperflüssigkeiten und Vergleich der Expression mit der Expression von 7a5/Prognostin in einem gesunden Gewebe oder Körperflüssigkeit.
11. Verfahren zur Diagnose von tumoralen Erkrankungen nach Anspruch 10, wobei die Bestimmung der Expression von 7a5/Prognostin eine Hybridisierung, eine PCR, eine „real time“ (RT)-PCR, eine Antigen-Antikörper Bindung, einen ELISA, eine optische Proteom-Analyse, eine ein- oder mehrdimensionale Gelelektrophorese, eine massenspektrometrische Analyse, eine Chromatographie, eine Sequenzierung, Methylierungsanalyse, SNP-Bestimmung oder Kombinationen dieser Verfahren umfaßt.
12. Verfahren zur Diagnose von tumorösen Erkrankungen nach Anspruch 10 oder 11, wobei die tumoröse Erkrankung metastasierend ist, und insbesondere metastasierender Kolonkrebs ist.
13. Verfahren zur Diagnose von tumoralen Erkrankungen nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei die biologische Probe aus einer Tumorbiopsie aus Darm, Leber, Lymphknoten, Lunge, Knochen oder Hirn oder Körperflüssigkeiten abgeleitet ist.
14. Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen, umfassend eine Modulation der Expression von 7a5/Prognostin.

15. Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen nach Anspruch 14, umfassend die Verabreichung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 8.
16. Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen nach Anspruch 14 oder 15, wobei die tumoröse Erkrankung metastasierender Kolonkrebs ist.
17. Verfahren zur Auffindung von Substanzen, die an 7a5/Prognostin binden, umfassend
 - a) in Kontakt bringen einer Zelle, die 7a5/Prognostin exprimiert mit einer Kandidaten-Substanz,
 - b) Nachweisen der Anwesenheit der Kandidaten-Substanz, die an 7a5/Prognostin bindet, und
 - c) Bestimmen, ob die Kandidaten-Substanz auch an 7a5/Prognostin bindet.
18. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die Schritte des Verfahrens nach Anspruch 17 und Formulieren der in Schritt c) identifizierten Substanz in eine pharmazeutisch akzeptable Form.
19. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, eines Polypeptids nach Anspruch 2, eines Oligonukleotids nach Anspruch 3, eines Antikörpers nach Anspruch 7 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 8 zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen.
20. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, eines Polypeptids nach Anspruch 2, eines Oligonukleotids nach Anspruch 3, eines Antikörpers nach Anspruch 7 oder einer diagnostischen Zusammensetzung nach Anspruch 9 zur Diagnose von tumorösen Erkrankungen.
21. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 als Marker für humane Erbkrankheiten.
22. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder eines Oligonukleotids nach Anspruch 3 zur Gentherapie.

23. Diagnostischer Kit, umfassend eine diagnostische Zusammensetzung nach Anspruch 9, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Puffern und/oder Gebrauchsanweisungen.
24. Diagnostischer Kit nach Anspruch 23 in Form eines PCR-, insbesondere RT-PCR-, oder ELISA-Kits.

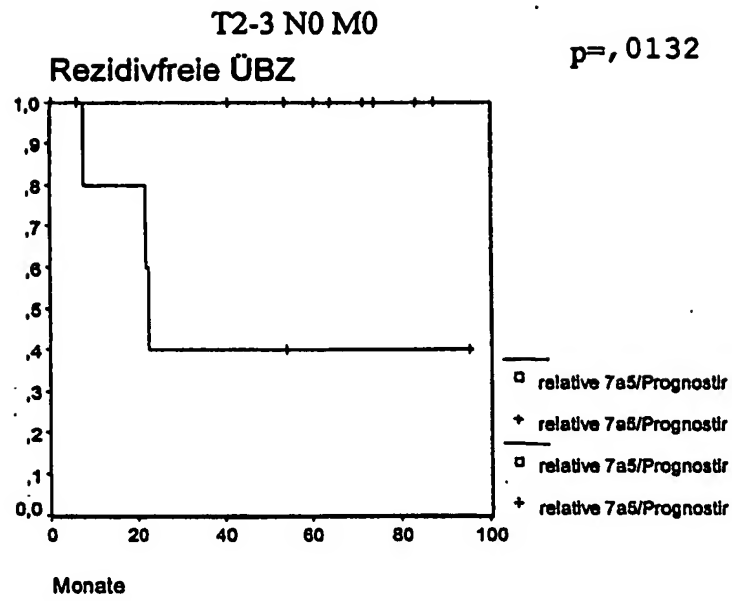
U30057
Universitätsklinikum Charité

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid von 7a5/Prognostin kodiert und dessen Verwendungen, insbesondere für die Tumordiagnostik und Tumorthapie bei metastasierenden Tumoren.

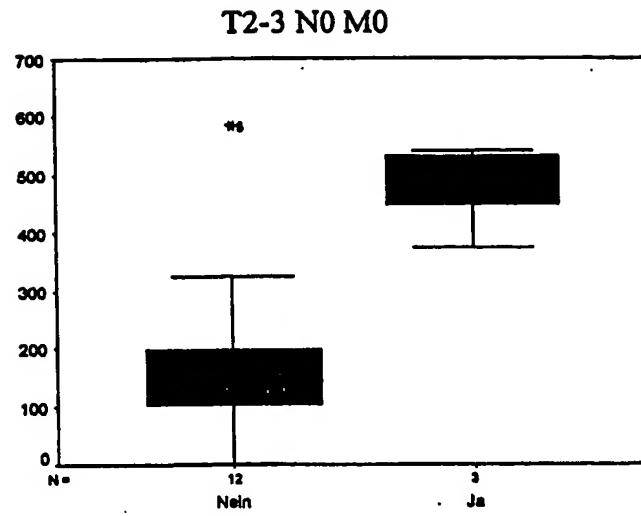
Figur 1

Kumulatives
Überleben



Figur 2

relative 7a5/Prognostin-
Expression / SW620 (100%)



Figur 3

[illegible]

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

<120> 7a5/Prognostin und dessen Verwendung für die Tumordiagnostik und Tumorthherapie

<130> U30057

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2559

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgctaataca ctgaaagaaa acatttttcgg tcaggaagaa ttgcacaaag tatgtctgaa      60
gcaaatttga ttgacatgga agctggaaaa ctctcaaaaa gttgcaatat tacagaatgc      120
caggaccag acttgcttca caattggccg gatgctttca cccttcgtgg taataatgct      180
tccaaagttg caaatccatt ctggaatcaa ctgtctgctt ctaaccatt tttggatgac      240
ataactcaac taagaaataa caggaagaga aataatattt ccatcttaaa ggaagatcct      300
tttcttttct gtagagaaat agaaaatgga aattcttttg attcctccgg tgatgaactt      360
gatgtgcatc agttacttag gcagacttcc tcaagaaatt ctggaagatc taaaagtgtt      420
tcagaacttc tggacatttt agacgacaca gcacatgcc atcagagtat acataactct      480
gaccagatcc tactacacga cttagagtgg cttaaaaatg atcgggaggc ttataaaatg      540
gcttggttaa gtcaacgcca gctggcccg tcctgccttg atttgaatac aattagtcag      600
agccctggat gggcccagac acaacttgcg gaggtcacca tagcttgcaa agtaaaccat      660
caaggagggt cagtacaatt acctgaatca gacatcactg ttcatgtgcc ccaaggatcat      720
gtggctgtgg gagaattcca agaggtgtct ctaagggtct tccttgatcc gccacacatg      780
cttaaccatg atctttcgtg cactgtgagc ccgttggttg aaatcatgtt aggcaacctc      840
aatacaatgg aagccctttt gctggagatg aaaattgggg ctgaagtaag aaaggatcct      900
ttcagccaag tcatgacaga aatggtgtgt ttacacagct tgggtaaaga aggccctttt      960
aaagttttta gcaactgcta catttataaa gacaccatcc aagtcaagct aatcgacttg      1020
agtcaggtaa tgtatctagt gggtgctgca caagctaaag ctcttcctgc accagctgcc      1080
accatttggg attatatcca caaaaccacc tcaattggaa tttatggacc caaatatata      1140
catcccagtt ttactgttgt tttaacagtt tgtggacaca attatatgcc aggacagctt      1200
acaatttctg atattaagaa ggggtgaaaa aacatatctc cagttgtgtt tcagctctgg      1260
gggaagcagt catttttact tgacaagcca caagatttaa gtatttctat ttttctctgt      1320

```

gatcctgatt ttgaagtaaa gacagaagga gaaaggaaag aaattaaaca aaagcagttg 1380
gaagcaggtg aagtagttca tcaacaattt ttattttctt tagttgagca cagagagatg 1440
cacttgtttg atttttgtgt tcaagtggag cctcccaatg gtgaaccagt tgcacagttc 1500
tctatcacta ctctgatcc aaccccaaac ctaaaaagac tctcgaatct gccaggctat 1560
ttgcagaaga aggaggaaat caagtctgct cctttatcac caaaaattct tgttaaatat 1620
cctacatttc aagataaaac attgaacttt agcaactatg gggtaaccct gaaggcagtg 1680
ctaagacaaa gcaagattga ttacttcctt gaatatttca aaggggacac aatagctctc 1740
ctcggggaag gtaaggtaaa agctattggt cagtccaaag tgaaagaatg gtatgttaga 1800
gtcctcagag gtaagattgg acttgtagac tgcaaaaatg tcaaggatg ttcaaaggag 1860
caagtaatgt ttatgtcaga tagtgtcttt acaaccagaa atcttcttga acagattgtc 1920
ctgcctttaa aaaaattgac ttatatctac tcagttgtat taaccttggg gtcagaaaaa 1980
gtttatgatt ggaaagtttt agctgatgtc ctgggttact cacatctgtc cctggaagat 2040
tttgatcaaa ttcaagcaga caaagaatca gagaaagttt cttatgttat aaagaagtta 2100
aaggaagatt gccacacaga gagaaataca aggaagtttc tgtatgaact tattgtggct 2160
cttctgaaaa tggattgcca agagttagtc gcacgtctca tccaagaagc tgctgttctg 2220
acttcagctg tcaagcttgg aaaaggctgg agggaactag ctgaaaagtt agtacgactc 2280
acaaagcaac aaatggaggc atatgaaatt cctcatcgag gaaacactgg agatgttgc 2340
gttgagatga tgtggaaacc tgcctatgat tttctgtata cctggagtgc tcaactatgga 2400
aataactaca gagatgtgtt acaagacctt cagtcagctt tggacagaat gaaaaaccct 2460
gtgactaaac actggagaga attaactgga gttttaatac tagtaaattc tttggaggtt 2520
ttgagagtaa ctgcattctc cacttctgag gaagtatag 2559

<210> 2
<211> 852
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Ile Thr Glu Arg Lys His Phe Arg Ser Gly Arg Ile Ala Gln
1 5 10 15

Ser Met Ser Glu Ala Asn Leu Ile Asp Met Glu Ala Gly Lys Leu Ser
20 25 30

Lys Ser Cys Asn Ile Thr Glu Cys Gln Asp Pro Asp Leu Leu His Asn
35 40 45

Trp Pro Asp Ala Phe Thr Leu Arg Gly Asn Asn Ala Ser Lys Val Ala
50 55 60

Asn Pro Phe Trp Asn Gln Leu Ser Ala Ser Asn Pro Phe Leu Asp Asp
65 70 75 80

Ile Thr Gln Leu Arg Asn Asn Arg Lys Arg Asn Asn Ile Ser Ile Leu
85 90 95

Lys Glu Asp Pro Phe Leu Phe Cys Arg Glu Ile Glu Asn Gly Asn Ser
100 105 110

Phe Asp Ser Ser Gly Asp Glu Leu Asp Val His Gln Leu Leu Arg Gln
115 120 125

Thr Ser Ser Arg Asn Ser Gly Arg Ser Lys Ser Val Ser Glu Leu Leu
130 135 140

Asp Ile Leu Asp Asp Thr Ala His Ala His Gln Ser Ile His Asn Ser
145 150 155 160

Asp Gln Ile Leu Leu His Asp Leu Glu Trp Leu Lys Asn Asp Arg Glu
165 170 175

Ala Tyr Lys Met Ala Trp Leu Ser Gln Arg Gln Leu Ala Arg Ser Cys
180 185 190

Leu Asp Leu Asn Thr Ile Ser Gln Ser Pro Gly Trp Ala Gln Thr Gln
195 200 205

Leu Ala Glu Val Thr Ile Ala Cys Lys Val Asn His Gln Gly Gly Ser
210 215 220

Val Gln Leu Pro Glu Ser Asp Ile Thr Val His Val Pro Gln Gly His
225 230 235 240

Val Ala Val Gly Glu Phe Gln Glu Val Ser Leu Arg Ala Phe Leu Asp
245 250 255

Pro Pro His Met Leu Asn His Asp Leu Ser Cys Thr Val Ser Pro Leu
260 265 270

Leu Glu Ile Met Leu Gly Asn Leu Asn Thr Met Glu Ala Leu Leu Leu
275 280 285

Glu Met Lys Ile Gly Ala Glu Val Arg Lys Asp Pro Phe Ser Gln Val
290 295 300

Met Thr Glu Met Val Cys Leu His Ser Leu Gly Lys Glu Gly Pro Phe
305 310 315 320

Lys Val Leu Ser Asn Cys Tyr Ile Tyr Lys Asp Thr Ile Gln Val Lys
325 330 335

Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu Val Val Ala Ala Gln Ala
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ala Ala Thr Ile Trp Asp Tyr Ile His Lys
355 360 365

Thr Thr Ser Ile Gly Ile Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile His Pro Ser Phe
370 375 380

Thr Val Val Leu Thr Val Cys Gly His Asn Tyr Met Pro Gly Gln Leu
385 390 395 400

Thr Ile Ser Asp Ile Lys Lys Gly Gly Lys Asn Ile Ser Pro Val Val
405 410 415

Phe Gln Leu Trp Gly Lys Gln Ser Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp
420 425 430

Leu Ser Ile Ser Ile Phe Ser Cys Asp Pro Asp Phe Glu Val Lys Thr
435 440 445

Glu Gly Glu Arg Lys Glu Ile Lys Gln Lys Gln Leu Glu Ala Gly Glu
450 455 460

Val Val His Gln Gln Phe Leu Phe Ser Leu Val Glu His Arg Glu Met
465 470 475 480

His Leu Phe Asp Phe Cys Val Gln Val Glu Pro Pro Asn Gly Glu Pro
485 490 495

Val Ala Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Pro Asn Leu Lys
500 505 510

Arg Leu Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Leu Gln Lys Lys Glu Glu Ile Lys
515 520 525

Ser Ala Pro Leu Ser Pro Lys Ile Leu Val Lys Tyr Pro Thr Phe Gln
530 535 540

Asp Lys Thr Leu Asn Phe Ser Asn Tyr Gly Val Thr Leu Lys Ala Val
545 550 555 560

Leu Arg Gln Ser Lys Ile Asp Tyr Phe Leu Glu Tyr Phe Lys Gly Asp
565 570 575

Thr Ile Ala Leu Leu Gly Glu Gly Lys Val Lys Ala Ile Gly Gln Ser
580 585 590

Lys Val Lys Glu Trp Tyr Val Gly Val Leu Arg Gly Lys Ile Gly Leu
595 600 605

Val His Cys Lys Asn Val Lys Val Ile Ser Lys Glu Gln Val Met Phe
610 615 620

Met Ser Asp Ser Val Phe Thr Thr Arg Asn Leu Leu Glu Gln Ile Val
625 630 635 640

Leu Pro Leu Lys Lys Leu Thr Tyr Ile Tyr Ser Val Val Leu Thr Leu
645 650 655

Val Ser Glu Lys Val Tyr Asp Trp Lys Val Leu Ala Asp Val Leu Gly
660 665 670

Tyr Ser His Leu Ser Leu Glu Asp Phe Asp Gln Ile Gln Ala Asp Lys
675 680 685

Glu Ser Glu Lys Val Ser Tyr Val Ile Lys Lys Leu Lys Glu Asp Cys
690 695 700

His Thr Glu Arg Asn Thr Arg Lys Phe Leu Tyr Glu Leu Ile Val Ala
705 710 715 720

Leu Leu Lys Met Asp Cys Gln Glu Leu Val Ala Arg Leu Ile Gln Glu
725 730 735

Ala Ala Val Leu Thr Ser Ala Val Lys Leu Gly Lys Gly Trp Arg Glu
740 745 750

Leu Ala Glu Lys Leu Val Arg Leu Thr Lys Gln Gln Met Glu Ala Tyr
755 760 765

Glu Ile Pro His Arg Gly Asn Thr Gly Asp Val Ala Val Glu Met Met
770 775 780

Trp Lys Pro Ala Tyr Asp Phe Leu Tyr Thr Trp Ser Ala His Tyr Gly
785 790 795 800

Asn Asn Tyr Arg Asp Val Leu Gln Asp Leu Gln Ser Ala Leu Asp Arg

805

810

815

Met Lys Asn Pro Val Thr Lys His Trp Arg Glu Leu Thr Gly Val Leu
820 825 830

Ile Leu Val Asn Ser Leu Glu Val Leu Arg Val Thr Ala Phe Ser Thr
835 840 845

Ser Glu Glu Val
850

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ttcttttgat tcttccggtg a

21

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
actctgatgg gcatgtgctg

20

<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
gcagacttcc tcaagaaatt ctggaagatc ta

32

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
agtgtttcag aacttctgga catttttagac ga

32